

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6 C12Q 1/68	A1	(11) 国際公開番号 WO99/09213 (43) 国際公開日 1999年2月25日 (25.02.99)
(21) 国際出願番号 PCT/JP98/03566 (22) 国際出願日 1998年8月10日 (10.08.98) (30) 優先権データ 特願平9/231885 1997年8月14日 (14.08.97) JP 特願平9/305016 1997年10月21日 (21.10.97) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 寶酒造株式会社(TAKARA SHUZO CO., LTD.)(JP/JP) 〒612-8061 京都府京都市伏見区竹中町609番地 Kyoto, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 山本純子(YAMAMOTO, Junko)(JP/JP) 〒520-0831 滋賀県大津市松原町17-10-405 Shiga, (JP) 向井博之(MUKAI, Hiroyuki)(JP/JP) 〒524-0102 滋賀県守山市水保町字南川1461-82 Shiga, (JP) 日野文嗣(HINO, Fumitsugu)(JP/JP) 〒525-0028 滋賀県草津市上笠3-9-8 Shiga, (JP) 加藤郁之進(KATO, Ikunoshin)(JP/JP) 〒611-0028 京都府宇治市南陵町1-1-150 Kyoto, (JP)		(74) 代理人 弁理士 細田芳徳(HOSODA, Yoshinori) 〒540-0012 大阪府大阪市中央区谷町二丁目8番1号 大手前M2ビル 細田国際特許事務所 Osaka, (JP) (81) 指定国 CN, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書
(54)Title: METHODS FOR DNA AMPLIFICATION AND KITS THEREFOR (54)発明の名称 DNA増幅方法及びそのキット (57) Abstract Methods for DNA amplification wherein a DNA is amplified by using a DNA fragment having nucleotide analogs as a template in the presence of the nucleotide analogs, characterized in that the amplification is effected in the presence of nucleotide analogs of two or more types and/or a compound capable of lowering the T _m value of a double-stranded nucleic acid; and kits for amplifying a DNA by using a DNA fragment having nucleotide analogs as a template in the presence of the nucleotide analogs, characterized by containing nucleotide analogs of two or more types and/or a compound capable of lowering the T _m value of a double-stranded nucleic acid. According to these methods, DNA fragments originating in RNAs can be amplified without preliminarily purifying the RNAs in samples, which contributes to the simplification of the experimental procedures and improvement in the reproducibility.		

(57)要約

ヌクレオチドアナログを含有するDNA断片を鋳型とし、ヌクレオチドアナログの存在下にDNAを増幅する方法において、2種以上のヌクレオチドアナログの存在下又は二本鎖核酸のT_m値を低下させる化合物の存在下で行うことを特徴とするDNA増幅方法、あるいは1種又は2種以上のヌクレオチドアナログ及び二本鎖核酸のT_m値を低下させる化合物の存在下で行うことを特徴とするDNA増幅方法、ならびにヌクレオチドアナログを含有するDNA断片を鋳型とし、ヌクレオチドアナログの存在下にDNAを増幅するためのキットであって、2種以上のヌクレオチドアナログ又は二本鎖核酸のT_m値を低下させる化合物を含有することを特徴とするキット、あるいは1種又は2種以上のヌクレオチドアナログ及び二本鎖核酸のT_m値を低下させる化合物を含有することを特徴とするキット。本発明により、あらかじめ試料中のRNAを精製することなく、RNA由来のDNA断片を増幅することができ、実験操作の簡略化、並びに再現性の向上がもたらされる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	ML	マリ	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
CA	カナダ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	US	米国
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	VN	ヴェトナム
CH	スイス	IN	インド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラビア
CI	コートジボワール	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZW	ジンバブエ
CM	カメルーン	IT	イタリア	NO	ノルウェー		
CN	中国	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CU	キューバ	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CY	キプロス	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CZ	チェコ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KR	韓国	RU	ロシア		
DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
EE	エストニア	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		
ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール		

明細書

DNA増幅方法及びそのキット

技術分野

本発明は、DNA増幅法、特にDNAの混在下においてもRNAに対応する塩基配列のみを選択的に増幅することが可能なRT-PCR法、並びに該DNA増幅方法に使用されるキットに関する。

背景技術

DNA増幅法、特にポリメラーゼ・チェーン・リアクション（PCR）法は試験管内において簡便に所望の核酸断片を増幅する技術であり、現在では遺伝子に関する研究のみならず生物学、医学、農業等幅広い分野において不可欠の実験手法となっている。PCR法は本来DNAを増幅する技術であるが、RNAに対応する塩基配列を有するDNA断片を増幅するPCR法が開発されており、RT-PCR法と呼ばれている。該方法は、DNAポリメラーゼの一種であり、RNA依存性DNAポリメラーゼ活性、すなわち逆転写活性を有する逆転写酵素、あるいは逆転写活性を合せ持つDNAポリメラーゼを用いてRNAに相補的なDNA転写物（cDNA）を合成し、続いてこれを鋳型としてPCRを行うことによりRNA由来cDNAを特異的に増幅する方法である。RT-PCR法はmRNA由来のcDNAのクローニングやcDNAライブラリーの作製に利用されるほか、特定のmRNAの発現状態を調べる方法としても有用である。

しかしRT-PCRに使用されるRNA試料中にDNAが混在している場合には、RNAをコードしているDNA上の領域や偽遺伝子がPCRの鋳型となった産物が同時に増幅されてくるため、RNAを鋳型とした増幅産物のみを選択的に取得することは困難である。このようなRNA試料中に混在したDNA由来の増

幅産物の生成を防ぐために、精製されたRNAを試料として用いるか、あるいはDNA分解酵素処理等によって混在DNAを除去した試料を用いる必要があり、操作が煩雑になる。

この問題を解決する方法として、ヌクレオチドアナログであるdITP存在下の逆転写反応によってT_m値、すなわち融解温度の低いRNA-cDNA二本鎖核酸を合成し、更に同じヌクレオチドアナログの存在下、低温の変性温度でPCR反応を行い、試料中に混在するDNAに起因する産物の増幅を抑制し、RNAに相補的なcDNA由来のDNA断片を選択的に増幅させる方法が提案されている[ヌクレイック アシッズ リサーチ (Nucl. Acids Res.) 第24巻、第5021~5025頁(1996)]。しかし、該方法は増幅させる塩基配列のGC含量に応じてdITPの添加量や反応温度を変化させる必要があり、至適条件を探すのは困難である。更に、反応性においても満足できるものではなく、標的となる塩基配列によっては選択的な増幅が起こらない場合もある。

発明の開示

本発明の目的は、従来技術の方法の欠点を克服し、DNAの混在下においても、RNAに対応する塩基配列を有するDNA断片のみを選択的に得ることが可能であり、かつ汎用性、再現性、検出感度に優れたDNA増幅方法を提供することにある。

本発明者らは、上記のヌクレオチドアナログを使用する方法の問題点の1つが、通常の二本鎖DNAは変性せず、かつヌクレオチドアナログが取込まれたcDNAと鋳型RNAからなるRNA-cDNA二本鎖核酸は変性するような温度条件を設定することが困難な点にあることを明らかにした。そしてこの問題がDNA増幅反応時にRNA-cDNA二本鎖核酸のT_m値を低下させる化合物、例えばホルムアミド等を添加することにより解決されることを見出した。

更に、本発明者らは、上記方法において合成されるDNA鎖へのヌクレオチド

アナログの取込みが標的RNAの塩基配列、特にGC含量に左右されることが上記方法のもう一つの問題点であると考えた。本発明者らは一定の頻度でDNAに取込まれるような2種類以上のヌクレオチドアナログを反応液に添加することにより、標的RNAのGC含量にかかわらず、再現性よくDNAの増幅が起こることを見出して、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明の要旨は、

〔1〕 ヌクレオチドアナログを含有するDNA断片を鋳型とし、ヌクレオチドアナログの存在下にDNAを増幅する方法において、2種以上のヌクレオチドアナログの存在下又は二本鎖核酸の T_m 値を低下させる化合物の存在下で行うことを特徴とするDNA増幅方法、

〔2〕 ヌクレオチドアナログを含有するDNA断片を鋳型とし、ヌクレオチドアナログの存在下にDNAを増幅する方法において、1種又は2種以上のヌクレオチドアナログ及び二本鎖核酸の T_m 値を低下させる化合物の存在下で行うことを特徴とするDNA増幅方法、

〔3〕 ヌクレオチドアナログを含有するDNA断片を鋳型とし、ヌクレオチドアナログの存在下にDNAを増幅するためのキットであって、2種以上のヌクレオチドアナログ又は二本鎖核酸の T_m 値を低下させる化合物を含有することを特徴とするキット、ならびに

〔4〕 ヌクレオチドアナログを含有するDNA断片を鋳型とし、ヌクレオチドアナログの存在下にDNAを増幅するためのキットであって、1種又は2種以上のヌクレオチドアナログ及び二本鎖核酸の T_m 値を低下させる化合物を含有することを特徴とするキット、

に関する。

発明を実施するための最良の形態

本発明のDNA増幅方法は、ヌクレオチドアナログを含有するDNA断片を鋳

型とし、ヌクレオチドアナログの存在下にDNAを増幅する方法において、2種以上のヌクレオチドアナログの存在下及び／又は二本鎖核酸の T_m 値を低下させる化合物の存在下で行うことを1つの大きな特徴とする。

本発明の方法において、増幅反応の鋳型となるDNA断片は、1種又は2種以上のヌクレオチドアナログの存在下にRNAを鋳型とした逆転写反応によって作製されたcDNAが用いられる。逆転写反応はさらに二本鎖核酸の T_m 値を低下させる化合物の存在下で行っても良い。

本発明の方法を適用することができるRNAを含む試料には特に限定はないが、例えば細胞、組織、血液のような生体由来試料、食品、土壌、排水のような生物を含有する可能性のある試料が挙げられる。また、前記試料等を公知の方法で処理することによって得られる核酸含有調製物であってもよい。該調製物としては、例えば細胞破碎物やそれを分画して得られる試料、該試料中の全RNA、あるいは特定のRNA分子群、例えばmRNAを富化した試料等が本発明に使用できる。なお、これらの試料はDNAを含有するものであっても共存するDNAの影響を受けることはなく、RNAに対応するDNAが選択的に増幅される。また、公知の方法によってDNAが除去された試料を用いてもよい。

本発明の方法により増幅されるRNAとしては、特に制限はなく、試料中の全RNA、mRNA、tRNA、rRNA等のRNA分子群、あるいは特定のRNA分子が挙げられ、逆転写及び増幅反応に使用されるプライマーが作製可能な任意のRNAが挙げられる。例えば、該標的RNAの有無やその量の増減が特定の疾患を指示するものであれば本発明の方法により該疾患の診断を行うことが可能であり、また、微生物に特異的なRNAを標的とすることにより、試料中の該微生物の存在を検出することができる。前記増幅対象のRNAの1回の逆転写反応における使用量は、逆転写反応を行なうに十分な量であればよく、例えば、感度の観点から、好ましくは0.1 μ g以上であり、さらに好ましくは0.5 μ g以上であり、反応阻害の観点から、好ましくは2 μ g以下であり、さらに好ましく

は1 μ g以下である。

本発明において標的RNAからのcDNA合成に使用されるプライマーは、標的RNAに相補的な塩基配列を有するオリゴヌクレオチドであり、使用される反応条件において標的RNAに対してアニールするものであれば特に限定されるものではない。該プライマーは、オリゴ(dT)等のオリゴヌクレオチドやランダムな配列を有するオリゴヌクレオチド(ランダムプライマー)であってもよい。

前記プライマーの長さは、特異的なアニーリングを行なう観点から、好ましくは6ヌクレオチド以上であり、さらに好ましくは10ヌクレオチド以上であり、オリゴヌクレオチドの合成の点から、好ましくは100ヌクレオチド以下であり、さらに好ましくは30ヌクレオチド以下である。前記オリゴヌクレオチドは、例えばABI社(Applied Biosystems Inc.)のDNAシンセサイザー394型を用いて、ホスホアミダイト法により合成できる。他にもリン酸トリエステル法、H-ホスホネート法、チオホスファイト法等いかなる方法で合成されたものでもよい。また、生物試料由来のオリゴヌクレオチドであってもよく、例えば該試料より調製したDNAの制限エンドヌクレアーゼ消化物から単離して作製してもよい。逆転写反応液中の前記プライマーの使用量は、標的RNAからのcDNA合成を行なうために十分な量であればよく、合成効率の観点から、好ましくは0.1 μ M以上であり、さらに好ましくは0.5 μ M以上であり、反応阻害の観点から、好ましくは10 μ M以下であり、さらに好ましくは5 μ M以下である。

また、DNAの増幅反応(PCR)に使用されるプライマーも、標的RNAに対応するcDNAを鋳型とするDNAの増幅に使用可能であれば特に限定はなく、上記同様の種々のオリゴヌクレオチドを使用することができる。上記の標的RNAからのcDNA合成に使用されるプライマーをDNAの増幅反応に使用してもよい。PCR反応液中の前記プライマーの使用量は、標的RNAを鋳型として得られたcDNAを鋳型として二本鎖DNA合成を行なうために十分な量であればよく、合成効率の観点から、好ましくは0.05 μ M以上であり、さらに好ま

しくは0.1 μ M以上であり、反応特異性の観点から、好ましくは2 μ M以下であり、さらに好ましくは1 μ M以下である。

本発明で用いられる逆転写活性を有する酵素としては、RNAを鋳型としたcDNA合成活性を有するものであれば特に限定はなく、例えばトリ骨髄芽球症ウイルス由来逆転写酵素（AMV-RTase）、モロニーネズミ白血病ウイルス由来逆転写酵素（MMLV-RTase）、ラウス関連ウイルス2由来逆転写酵素（RAV-2-RTase）等、種々の起源の逆転写酵素が挙げられる。このほか、逆転写活性を併せ持つDNAポリメラーゼを使用することもでき、例えば、サーマス・サーモフィラス由来DNAポリメラーゼ（Tth DNAポリメラーゼ）、バチルス・カルドテナックス由来DNAポリメラーゼ（Bca DNAポリメラーゼ）等を使用してもよい。AMV-RTase又はRAV-2-RTaseが好ましい。これらの酵素はその本来の起源より精製して取得されたもの、あるいは遺伝子工学的に生産された組換え蛋白質のいずれであってもよい。前記逆転写活性を有する酵素の使用量は、逆転写反応を行なうに十分な量であればよい。

本発明のDNAの増幅方法は、上記逆転写反応により生成したcDNAを鋳型としたDNA増幅反応を行なって該DNAを増幅することを1つの大きな特徴とする。DNA増幅反応としてはPCR法（特公平4-67957号公報、特公平4-67960号公報）が好適である。

PCR法に用いるDNAポリメラーゼとしては、種々の耐熱性DNAポリメラーゼ、例えばサーマス・サーモフィラス由来のDNAポリメラーゼ（Tth DNAポリメラーゼ）、サーマス・アクアティカス由来のDNAポリメラーゼ（Taq DNAポリメラーゼ）、ピロコッカス・フリオサス由来DNAポリメラーゼ（Pfu DNAポリメラーゼ）等の熱安定性DNAポリメラーゼが使用でき、これらの酵素は単独で又は混合して使用してもよい。これらの酵素はその本来の起源より精製して取得された蛋白質、あるいは遺伝子工学的に生産された組換

え蛋白質のいずれであってもよい。

また、逆転写酵素として、前記した逆転写活性を併せ持つDNAポリメラーゼを使用した場合、PCR反応においても再度同じDNAポリメラーゼを使用することができるため、逆転写反応及びPCR反応を1つの反応チューブを用いて行なうことができる。

前記DNAポリメラーゼの量は、通常ポリメラーゼ反応を行なう際に用いられる量であればよい。

本明細書に記載のヌクレオチドアナログとは、dATP、dCTP、dGTP、dTTP以外の物質であって、RNAを鋳型とするcDNA合成反応、並びに該cDNAを鋳型とするDNA増幅反応において新規に合成されるcDNA中に取込まれ、かつ該反応を停止させないものである。特に、これらが取込まれることによってDNAのT_m値を低下させる性質を有するものが本発明に使用される。本発明に使用されるヌクレオチドアナログとしては、特に限定するものではないが、7-Deaza-dGTP、7-Deaza-dATP、dITP、ヒドロキシメチルdUTP等が使用できる。

1種のヌクレオチドアナログを使用するcDNA合成、並びにDNA増幅では標的となるRNAのGC含量によってヌクレオチドアナログの取込み頻度が左右される場合がある。例えば、dITPはdGTPに代ってDNA鎖に取込まれるが、同一反応条件下では標的RNAのGC含量が高いほどその取込み頻度は高くなる場合がある。本発明では、適当な2種以上のヌクレオチドアナログを組合せて使用し、これらのヌクレオチドアナログを合わせた取込み頻度が標的RNAのGC含量の影響を受けないようにすることにより、上記RNAに対応する産物の選択的増幅が起こる条件を容易に設定できるようになる。

このようなヌクレオチドアナログの組合せには特に限定はなく、均一な取込みが起こるような2種以上のヌクレオチドアナログを適宜組合せて使用することができる。例えばdATPあるいはdTTPに代ってDNA鎖に取込まれるヌクレ

オチドアナログとdCTPあるいはdGTPに代ってDNA鎖に取込まれるヌクレオチドアナログとの組合せを本発明に使用することができ、特に好ましくは7-Deaza-dATPと7-Deaza-dGTPとの組合せを使用することができる。

逆転写反応液中のヌクレオチドアナログの含有量は、T_m値を低下させる効果を十分に発揮させる観点から、好ましくは50 μM以上であり、さらに好ましくは55 μM以上であり、反応効率の観点から、好ましくは1.5 mM以下であり、さらに好ましくは200 μM以下である。このとき、dNTPの含有量は、各200 μM以上、1 mM以下であることが望ましい。

PCR反応液中のヌクレオチドアナログの含有量は、T_m値を低下させる効果を十分に発揮させる観点から、好ましくは10 μM以上であり、さらに好ましくは11 μM以上であり、反応効率の観点から、好ましくは1.5 mM以下であり、さらに好ましくは200 μM以下である。このとき、dNTPの含有量は各200 μM以上、1 mM以下であることが望ましい。

本明細書において、「二本鎖核酸のT_m値を低下させる化合物」とは、cDNA合成、並びにDNA増幅反応時に基質として核酸中に取り込まれる物質以外のものであって、その存在下において二本鎖核酸、例えば二本鎖DNA、RNAとDNAから形成されたRNA-DNA二本鎖核酸等が一本鎖に変性する解離温度（T_m値）を低下させる作用を有するものを意味する。このような化合物としては、ホルムアミド、ジメチルスルホキシド（DMSO）等の有機溶剤、トリメチルグリシンに代表される両電解物質（ベタイン類）を使用することができる。特にホルムアミドはDNAポリメラーゼの伸長活性に悪影響を与えないと言われており、本発明に好適である。また、これらの2種以上を混合して使用してもよく、例えばホルムアミドとジメチルスルホキシドとを組合せて使用することにより、良好な結果を得ることができる。

また、該ヌクレオチドアナログが1種であっても鋳型として用いるRNAの種



類によっては、GC含量の影響を受けない場合もある。かかる場合においては、さらに二本鎖核酸の T_m 値を低下させる化合物を使用することにより、より良好な結果を得ることができ、このような態様も本発明の範囲内である。

二本鎖核酸の T_m 値を低下させる化合物の逆転写反応液中の含有量は、反応阻害の観点から、好ましくは20重量%以下であり、さらに好ましくは10重量%以下である。また、PCR反応時においては、前記化合物のPCR反応液中の含有量は、 T_m 値低下の観点から、好ましくは0.5重量%以上であり、さらに好ましくは1重量%以上であり、反応阻害の観点から、好ましくは、20重量%以下であり、さらに好ましくは15重量%以下である。

具体的には、ホルムアミドを使用する場合には、逆転写反応液中の含有量は、反応阻害の観点から、好ましくは20重量%以下であり、さらに好ましくは10重量%以下である。また、ホルムアミドのPCR反応液中の含有量は、 T_m 値低下の観点から、好ましくは1重量%以上であり、さらに好ましくは1.5重量%以上であり、反応阻害の観点から、好ましくは20重量%以下であり、さらに好ましくは15重量%以下である。

RNAからcDNAへの逆転写は、標的RNAを含む試料、該標的に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドであるプライマー、4種のデオキシヌクレオチドトリホスフェート、逆転写活性を有する酵素及び少なくとも1種のヌクレオチドアナログを含む反応液中で行われる。この反応により、ヌクレオチドアナログを含有し、前記標的RNA配列に対して相補的な塩基配列を有するDNA(cDNA)を合成することができる。また、得られたcDNAと標的RNAから形成される鋳型RNA-cDNA二本鎖核酸は、ヌクレオチドアナログを含有しない二本鎖核酸に比べて T_m 値が低下しており、例えばヌクレオチドアナログを含有しない通常の二本鎖DNAに比べて低い温度で一本鎖に解離するという優れた性質を発現する。

次に、上記のcDNAを鋳型としたDNA増幅反応、例えばPCRを実施し、

該 cDNA 由来の DNA 断片を増幅することができる。この際、上記の鋳型 RNA-cDNA 二本鎖核酸は変性し、かつ反応液中に混在するヌクレオチドアナログを含まない二本鎖 DNA は変性しないような条件、例えば PCR においては変性工程の温度を設定し、上記のヌクレオチドアナログの存在下に DNA 増幅反応を行うことにより、cDNA に対応する DNA 断片、すなわち標的 RNA に対応する DNA 断片を選択的に増幅させることが可能である。ただし、塩基配列や鎖長の異なる種々の RNA を標的とする場合には、逆転写反応時のヌクレオチドアナログ取込み頻度が標的 RNA ごとに変動するため、普遍性のある条件設定は難しい場合がある。このような場合には、DNA 増幅反応液に上記のような二本鎖核酸の Tm 値を低下させる化合物、例えばホルムアミドをさらに添加することにより、上記の選択的な増幅が起こる条件を容易に設定することが可能となる。例えば、終濃度 1 重量%~20 重量%のホルムアミドを添加して PCR を行う際には、変性温度を 80℃~85℃に設定することにより RNA に対応する増幅産物のみを得ることができる。すなわち本発明の DNA 増幅方法の態様として、DNA 増幅反応液に 2 種以上のヌクレオチドアナログを存在させて、あるいは二本鎖核酸の Tm 値を低下させる化合物を存在させて行なうが、特に好ましくはヌクレオチドアナログと Tm 値を低下させる化合物とを共に存在させる態様である。この場合存在させるヌクレオチドアナログは 1 種でも 2 種以上でもよい。ヌクレオチドアナログは PCR 反応液を調製する際に上記濃度となるように添加する。逆転写反応後に得られた溶液の一部をとって PCR 反応液を調製する場合、必要量のヌクレオチドアナログが逆転写反応液中に含まれていれば、それ以外の成分のみを添加して PCR 反応液としてもよい。

本発明の方法においては、上記の RNA を鋳型とする cDNA の合成反応、並びに該 cDNA を鋳型とする DNA 増幅反応とを連続して、同一の反応液を用いて実施することもできる。この場合には逆転写活性を有する酵素と PCR に用いられる DNA ポリメラーゼが共に含まれている反応液を使用する。このような反

応液は公知方法によって作製し、使用することができる〔バイオ テクニクス (Bio Techniques)、第18巻、第678～687頁(1995)〕。更に、逆転写活性を有する耐熱性DNAポリメラーゼを使用することにより、cDNA合成反応、DNA増幅反応を、逆転写反応に用いた酵素と同一の酵素で行うことも可能である。

本発明のキットは、上記の方法に用いられるキットであり、RNAに対応する塩基配列を有するDNAを選択的に増幅するキットである。このようなキットとしては、上記の1種又は2種以上のヌクレオチドアナログと二本鎖核酸のT_m値を低下させる化合物とを含有するもの、あるいは2種以上のヌクレオチドアナログ又は二本鎖核酸のT_m値を低下させる化合物を含有するもの等が挙げられる。なかでも、2種以上のヌクレオチドアナログと二本鎖核酸のT_m値を低下させる化合物を含有するキットは特に好適である。該キットは、逆転写酵素活性を有する酵素、該酵素の反応に使用する反応緩衝液、DNA増幅反応に使用されるDNAポリメラーゼやその他の試薬を含有するものであってもよい。また、上記のヌクレオチドアナログや二本鎖核酸のT_m値を低下させる化合物は使用時に適当な濃度となるよう、反应用緩衝液等に添加された状態であってもよい。このようなキットを使用することにより、DNAの混在するRNA試料からRNAに対応する塩基配列を有するDNA断片のみを選択的に増幅することが容易に行えるようになる。

実施例

次に、本発明を実施例により更に具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

実施例1 RNA、及びDNAの調製

以下の実験に使用するRNA、並びにDNAはヒト培養細胞HL-60(AT

CC CRL-1964)、あるいはヒト培養細胞HT-29(ATCC HTB-38)からライゾール試薬(ライフテック社製)を使用し、該試薬添付の説明書記載の操作により、それぞれ調製した。ヒト培養細胞HL-60由来のRNAの純度は OD_{260}/OD_{280} が1.8以上、DNAの純度は OD_{260}/OD_{280} が1.7以上であった。また、ヒト培養細胞HT-29由来のRNAの純度は OD_{260}/OD_{280} が1.8以上、DNAの純度は OD_{260}/OD_{280} が1.7以上であった。

実施例2 種々のRNAを標的としたRT-PCR

鎖長やGC含量の異なるmRNAを標的とした選択的な増幅を試みた。標的にはトランスフェリンレセプターmRNA中の621 baseの領域(GC含量38%)、サイトケラチンmRNA中の252 baseの領域(GC含量45%)、及び β -アクチンmRNA中の275 baseの領域(GC含量58%)を選んだ。トランスフェリンレセプターmRNAと β -アクチンmRNAの増幅にはヒト培養細胞HL-60由来のRNA、サイトケラチンmRNAの増幅にはヒト培養細胞HT-29由来のRNAをそれぞれ鋳型として使用した。

上記の標的を増幅するためのプライマーとして、トランスフェリンレセプターについてプライマーP5及びプライマーP6(配列表の配列番号:1及び2にそれぞれプライマーP5及びプライマーP6の塩基配列を示す)、サイトケラチンについてプライマーP1及びプライマーP2(配列表の配列番号:3及び4にそれぞれプライマーP1及びプライマーP2の塩基配列を示す)、 β -アクチンについてプライマーP7及びプライマーP8(配列表の配列番号:5及び6にそれぞれプライマーP7及びプライマーP8の塩基配列を示す)をそれぞれ合成した。

RNA PCR Kit (AMV) Ver. 2.1(宝酒造社製)を使用し、50 ngのRNA、あるいは50 ngのDNAと、上記のキットに添付のオリゴ

dTアダプタープライマーを含む20 μ lの逆転写反応液を調製した。基質ヌクレオチドは、上記のキット説明書どおりのもの（反応液1）、dGTPを表1の組成のdGTPとdITP（ベーリンガー・マンハイム社製）の混合物に置き換えたもの（反応液2～6、下記表1）及び反応液1に62.5 μ Mずつの7-Deaza-dATPと7-Deaza-dGTP（共にベーリンガー・マンハイム社製）を添加したもの（反応液7）の7通りの組成とした。これらの反応液をPCRサーマルサイクラー パーソナル（宝酒造社製）にセットし、50℃、20分～5℃、5分の逆転写反応を行なった。

表 1

	dGTP	dITP
反応液 2	1.75mM	0.25mM
反応液 3	1.5mM	0.5mM
反応液 4	1mM	1mM
反応液 5	0.5mM	1.5mM
反応液 6	0.25mM	1.75mM

次に上記のキットを使用し、各標的mRNAに対応するプライマー対を含むPCR反応液を調製した。更に、各PCR反応液についてホルムアミドを添加したものも準備した（各PCR反応液中のホルムアミドの濃度はトランスフェリンレセプターについては6.25重量%、サイトケラチンについては7.5重量%、 β -アクチンについては13.75重量%とした）。これらの80 μ lを上記の逆転写反応後に得られた溶液に添加して総量100 μ lの反応液とし、これをPCRサーマルサイクラー パーソナルにセットして82℃、1分間～45℃、1分間～72℃、1分間を1サイクルとした30サイクルのPCRを実施した。

こうして得られた反応液の $8 \mu\text{l}$ をヌシーブ (NuSieve) 3 : 1 アガロース (FMC社製) を使用した 3 % アガロースゲル電気泳動に供した。反応終了後の各反応液中の産物の量は、電気泳動後のアガロースゲルをエチジウムブロマイド染色した後、紫外線照射することにより発した蛍光の強度を比較することにより評価した。得られた結果のうち、逆転写反応液に鋳型として RNA を加えたものについての結果を表 2 に示す。

表 2

標的	逆転写反応液	ホルムアミドー	ホルムアミド+
トランスフェリン レセプター	反応液 1	—	++
	反応液 2	—	+
	反応液 3	—	++
	反応液 4	+	++
	反応液 5	+	+
	反応液 6	—	±
	反応液 7	—	++
サイトケラチン	反応液 1	—	—
	反応液 2	—	—
	反応液 3	—	—
	反応液 4	—	+
	反応液 5	—	±
	反応液 6	±	±
	反応液 7	—	+
β -アクチン	反応液 1	—	++
	反応液 2	—	±
	反応液 3	—	++
	反応液 4	—	++
	反応液 5	—	±
	反応液 6	—	—
	反応液 7	—	++

— : 増幅は見られない
 ± : わずかな増幅が見られる
 + : 増幅が見られる
 ++ : 強い増幅が見られる

ホルムアミドを添加しない反応系でPCRを行なった場合には、ごく限られた反応液でのみ若干の増幅産物が得られたのに対し、ホルムアミドを添加した反応系では、逆転写反応に反応液4を用いることによりどの標的RNAについても増幅産物を得ることができた。更に、ホルムアミドを添加した反応系では、2種のヌクレオチドアナログを含む反応液7を用いることによりすべての標的RNAについて増幅産物を得ることができた。また、標的がサイトケラチンの場合、ヌクレオチドアナログを使用せずにPCR時にホルムアミドを添加したときには目的の増幅産物を得ることができなかった。なお、逆転写反応液に鋳型としてDNAを加えたものでは、反応液の組成にかかわらず増幅産物は得られなかった。

これらのことから、PCR時にホルムアミドを添加し、ヌクレオチドアナログとして、ある一定量のdITP又は7-Deaza-dATPと7-Deaza-dGTPとの組合せを用いることにより、種々のRNA由来のDNA断片を一定の温度条件でかつ効率よく増幅可能であることが示された。また、この条件ではDNAを鋳型とした増幅は起こらないことから、RNAを鋳型とするDNA断片が選択的に増幅されることも明らかになった。

実施例3 ヌクレオチドアナログの組合せの比較

ヒトトランスフェリンレセプターmRNA中の約2 kbの領域を標的として以下の実験を行なった。

RNA PCR Kit (AMV) Ver. 2. 1を使用し、ヒトHL-60細胞由来の50 ngのRNA、あるいは50 ngのDNAと上記のプライマーP4（配列表の配列番号：7にプライマーP4の塩基配列を示す）、及び下記に記載のヌクレオチドアナログをそれぞれ62. 5 μ Mの濃度で含む20 μ lの逆転写反応液を調製した。

反応液1：7-Deaza-dGTP

反応液 2 : 7-Deaza-dATP

反応液 3 : dITP

反応液 4 : dITP、7-Deaza-dATP

反応液 5 : 7-Deaza-dGTP、7-Deaza-dATP

これらの反応液をPCRサーマルサイクラー パーソナルにセットし、50℃、20分～5℃、5分の逆転写反応を行なった。

次に上記のRNA PCRキットを使用し、プライマーP4、プライマーP9（配列表の配列番号：8にプライマーP9の塩基配列を示す）を含むPCR反応液を調製した。これらの80μlを上記で得られた逆転写反応後の溶液に添加して総量100μlの反応液とし、これをPCRサーマルサイクラー パーソナルにセットして、84℃、1分間～60℃、30秒間～72℃、2分間を1サイクルとした30サイクルのPCRを実施した。

得られた反応液の8μlをアガロース L03（宝酒造社製）を使用した1%アガロースゲル電気泳動に供し、実施例2と同様にして評価した。その結果、すべての反応条件においてRNAを鋳型とする増幅断片のみが認められ、ヌクレオチドアナログを1種のみ添加した反応系の中では反応液2を使用した時に最も高い増幅効率が得られた。これにより、使用するヌクレオチドアナログの種類によって増幅効率の異なることが示された。また、2種のヌクレオチドアナログを使用した反応液4及び5は、共に1種のヌクレオチドアナログを添加したどの反応系よりも高い増幅効率を示した。また、鋳型としてDNAが添加された反応液では、その組成にかかわらず増幅産物は見られなかった。

実施例4 種々の酵素を逆転写反応に使用したRT-PCR

RNA PCR Kit (AMV) Ver. 2.1 (AMV-RTase)、
BcaBEST RNA PCR Kit (パチルス・カルドテナクス由来DN

Aポリメラーゼ（BcaBEST）宝酒造社製）、MMLV-RTase（ライフテック社製）を用いて、各々の酵素の説明書に準じて、ヒトHL-60細胞より調製したRNA 500 ng又はDNA 250 ngとプライマーP4を含み、終濃度62.5 μ Mの7-Deaza-dATP、7-Deaza-dGTPを添加した20 μ lの逆転写反応液を調製した。これらの反応液をPCRサーマルサイクラー パーソナルにセットし、下記のプログラムで逆転写反応を行なった。

逆転写反応プログラム

AMV RTase : 50°C、20分～5°C、5分

BcaBEST : 65°C、1分～30°C、1分の反応後、15分間かけて65°Cにし、65°C、15分～80°C、2分～5°C、5分

MMLV-RTase : 42°C、50分～70°C、15分～5°C、5分

次に、得られた逆転写反応後の溶液を用い、PCR反応液を調製した。BcaBESTを使用して逆転写反応を行なった場合はBcaBEST RNA PCR Kitを、それ以外の逆転写酵素を使用した場合はRNA PCR Kit (AMV) Ver. 2.1を用い、各キットの説明書を参考に、プライマーP4とP3（配列表の配列番号：7及び9にそれぞれプライマーP4及びプライマーP3の塩基配列を示す）を含み、更にホルムアミドを添加したPCR反応液を調製した。PCR反応液中のホルムアミド濃度は、BcaBEST RNA PCRキットを使用した場合は2.5重量%、RNA PCR Kit (AMV) Ver. 2.1を使用した場合は6.25重量%とした。これらのPCR反応液80 μ lを上記の逆転写反応後の溶液に添加して総量100 μ lの反応液とし、これをPCRサーマルサイクラー パーソナルにセットして82°C、30秒～60°C、30秒～72°C、1分を1サイクルとした30サイクルのPCRを実施した。

。

反応終了後、反応液より $8 \mu\text{l}$ をとってアガロース L 0 3 (宝酒造社製) を用いた 1 % アガロースゲル電気泳動に供し、実施例 2 と同様にして評価した。その結果、使用した酵素にかかわらず、鋳型として DNA が添加された反応液では増幅断片は見られず、また RNA が添加された反応液ではそのすべてで同じサイズ (9 6 4 b p) の増幅断片が認められた。

実施例 5 1 反応液による RT-PCR への応用

ヒトサイトケラチン mRNA 中の 2 5 2 base の領域を標的とし、逆転写反応と PCR とを 1 反応液中で行う RT-PCR を行なった。

ジーンアンプ EZ rTth RNA PCR Kit (パーキンエルマー社製) を使用し、(1) 該キット説明書記載の組成、(2) 終濃度 $300 \mu\text{M}$ の dITP 添加、(3) 終濃度各 $150 \mu\text{M}$ の 7-Deaza-dATP 及び 7-Deaza-dGTP、終濃度 2 重量 % ホルムアミドを添加、の 3 通りの反応液を調製した。各反応液には上記のプライマー P 1 とプライマー P 2、ヒト HT-29 細胞由来の RNA $1 \mu\text{g}$ 、及び該細胞由来の DNA 0、50、100、200 ng を添加した。これらの反応液のそれぞれについて、PCR サーマルサイクラー パーソナルを用いて以下の 2 通りの条件で RT-PCR を実施した。

条件 1 :

逆転写反応 (60°C 、30 分間) 1 回

変性 (94°C 、2 分間) 1 回

PCR (94°C 、30 秒間 ~ 60°C 、30 秒間 ~ 72°C 、1 分間)

30 回

条件 2 :

逆転写反応 (60°C 、30 分間) 1 回

変性 (82℃、2分間) 1回

P C R (82℃、30秒間～60℃、30秒間～72℃、1分間)

30回

こうして得られたP C R反応液の8 μ lをヌシーブ3 : 1アガロースを使用した3 %アガロースゲル電気泳動に供し、生成した増幅産物を分析した。その結果、条件1では反応液の組成にかかわらず、RNA由来の増幅産物(251bp)と共にDNA由来の増幅産物(604bp)が出現し、その増幅量は添加されたDNAの濃度に依存していた。条件2では(1)の反応液ではいずれの増幅産物も得られなかったが、(2)及び(3)の反応液ではRNAを鋳型とする増幅産物のみが得られた。この場合、(2)の反応液に比べて(3)の反応液の方が高い増幅効率を示した。

実施例6 ホルムアミドとジメチルスルホキシドとを併用したR T - P C R

反応液にホルムアミドのみを加えた場合とホルムアミドとジメチルスルホキシドとを併用した場合のR T - P C Rへの効果を比較した。

標的としたmRNA、及びその増幅に使用したプライマーは以下のとおりである。 β -アクチンmRNA中の275 baseの領域(GC含量58%) : プライマーP7及びプライマーP8。腫瘍壊死因子(TNF) mRNA中の325 baseの領域(GC含量61%) : プライマーP10及びプライマーP11(配列表の配列番号 : 10及び11にそれぞれプライマーP10及びプライマーP11の塩基配列を示す)。アポトーシス関連サイトカインであるM c 1 mRNA中の448 baseの領域(GC含量51%) : プライマーP12及びプライマーP13(配列表の配列番号 : 12及び13にそれぞれプライマーP12及びプライマーP13の塩基配列を示す)。

One Step RNA PCR Kit (宝酒造社製)を使用し、該キッ

トの説明書に従ってヒト培養細胞HL-60由来のRNA 1 μ gと上記の各標的に対応するプライマーを含み、各100 μ Mの7-Deaza-dGTP及び7-Deaza-dATPが添加された反応液を作製した。更に、この反応液のほか、各反応液に、それぞれ終濃度2、4、6、8、10重量%となるようにホルムアミドを添加したもの、並びにホルムアミドを終濃度2重量%及びジメチルスルホキシドを終濃度3重量%になるように添加したものの計7通りの反応液を各標的のそれぞれに対して準備した。これらの反応液をPCRサーマルサイクラーパーソナルにセットし、以下の条件でRT-PCRを実施した。

逆転写反応 (50℃、20分間) 1回

変性 (85℃、2分間) 1回

PCR (85℃、1分間～45℃、1分間～72℃、1分間)

30回

こうして得られた反応液の8 μ lをヌシープ3:1アガロースを使用した3%アガロースゲル電気泳動に供し、実施例2と同様にして、生成した増幅産物を分析した。その結果を表3に示す。

表 3

標的		β -アクチン	TNF	Mc l
有機溶剤無添加		—	—	—
ホルムアミド	2 重量%	+	—	—
	4 重量%	+	±	+
	6 重量%	+	+	—
	8 重量%	±	—	—
	10 重量%	—	—	—
ホルムアミド 2重量%及び ジメチルスルホキシド 3重量%		++	++	++

— : 増幅は見られない
 ± : わずかな増幅が見られる
 + : 増幅が見られる
 ++ : 強い増幅が見られる

表3に示されるように、ホルムアミドのみを使用して良好な増幅効率を得るためにはその濃度を標的RNAごとに調節する必要があるのに対し、ホルムアミドとジメチルスルホキシドを併用した場合には1種類の反応液でどの標的も効率よく増幅されることが示された。

実施例7 キット

本発明のDNA増幅方法に使用されるキットとして、以下のような20反応分のキットを作製した。

10×逆転写反応バッファー 40 μ l
 100mM Tris-HCl (pH 8.3)
 500mM KCl
 100mM MgCl₂

100mM DTT
500 μ M 7-deaza-dGTP
500 μ M 7-deaza-dATP
10mM dNTP

AMV逆転写酵素 (5U/ μ l) 20 μ l

2 \times PCR反応バッファー 800 μ l

20mM Tris-HCl (pH8.3)

100mM KCl

5重量% ホルムアミド

5重量% ジメチルスルホキシド

Taq DNAポリメラーゼ (5U/ μ l) 20 μ l

産業上の利用可能性

本発明は、RNA由来の塩基配列を有するDNAの選択的な増幅を可能にするものである。本発明の方法を用いることにより、あらかじめ試料中RNAを精製することなく、RNA由来のDNA断片を増幅することができ、実験操作の簡略化、並びに再現性の向上がもたらされる。

請求の範囲

1. ヌクレオチドアナログを含有するDNA断片を鋳型とし、ヌクレオチドアナログの存在下にDNAを増幅する方法において、2種以上のヌクレオチドアナログの存在下又は二本鎖核酸のT_m値を低下させる化合物の存在下で行うことを特徴とするDNA増幅方法。
2. ヌクレオチドアナログを含有するDNA断片を鋳型とし、ヌクレオチドアナログの存在下にDNAを増幅する方法において、1種又は2種以上のヌクレオチドアナログ及び二本鎖核酸のT_m値を低下させる化合物の存在下で行うことを特徴とするDNA増幅方法。
3. DNAの増幅を、ポリメラーゼ・チェーン・リアクション法によって行うことを特徴とする請求項1または2記載のDNA増幅方法。
4. DNA断片が、ヌクレオチドアナログの存在下にRNAを鋳型とした逆転写反応によって作製されたcDNAであることを特徴とする請求項1～3いずれか記載のDNA増幅方法。
5. DNA断片が、2種以上のヌクレオチドアナログの存在下にRNAを鋳型とした逆転写反応によって作製されたcDNAであることを特徴とする請求項4記載のDNA増幅方法。
6. ヌクレオチドアナログとして、該ヌクレオチドアナログが含有される二本鎖核酸のT_m値を低下させる性質を有するものを使用することを特徴とする請求

項 1～5 いずれか記載の DNA 増幅方法。

7. dATP または dTTP に代って DNA 鎖に取込まれるヌクレオチドアナログ及び dCTP または dGTP に代って DNA 鎖に取込まれるヌクレオチドアナログとを使用することを特徴とする請求項 1～6 いずれか記載の DNA 増幅方法。

8. ヌクレオチドアナログとして、7-Deaza-dGTP、7-Deaza-dATP、dITP および ヒドロキシメチル dUTP からなる群より選択された請求項 1～7 いずれか記載の DNA 増幅方法。

9. 二本鎖核酸の T_m 値を低下させる化合物として、ホルムアミド、ジメチルスルホキシド、およびトリメチルグリシンからなる群より選択された 1 種以上の化合物を使用することを特徴とする請求項 1～8 いずれか記載の DNA 増幅方法。

10. ヌクレオチドアナログを含有する DNA 断片を鋳型とし、ヌクレオチドアナログの存在下に DNA を増幅するためのキットであって、2 種以上のヌクレオチドアナログ又は二本鎖核酸の T_m 値を低下させる化合物を含有することを特徴とするキット。

11. ヌクレオチドアナログを含有する DNA 断片を鋳型とし、ヌクレオチドアナログの存在下に DNA を増幅するためのキットであって、1 種又は 2 種以上のヌクレオチドアナログ及び二本鎖核酸の T_m 値を低下させる化合物を含有することを特徴とするキット。

12. ヌクレオチドアナログの存在下でRNAに相補的なcDNAを合成するための試薬を含有することを特徴とする請求項10または11記載のキット。

13. ヌクレオチドアナログとして、該ヌクレオチドアナログが含有される二本鎖核酸のT_m値を低下させる性質を有するものを含有することを特徴とする請求項10～12いずれか記載のキット。

14. dATPまたはdTTPに代ってDNA鎖に取込まれるヌクレオチドアナログ及びdCTPまたはdGTPに代ってDNA鎖に取込まれるヌクレオチドアナログとを含有することを特徴とする請求項10～13いずれか記載のキット。

15. ヌクレオチドアナログとして、7-Deaza-dGTP、7-Deaza-dATP、dITPおよびヒドロキシメチルdUTPからなる群より選択された請求項10～14いずれか記載のキット。

16. 二本鎖核酸のT_m値を低下させる化合物として、ホルムアミド、ジメチルスルホキシド、およびトリメチルグリシンからなる群より選択された1種以上の化合物を含有することを特徴とする請求項10～15いずれか記載のキット。

配列表
SEQUENCE LISTING

<110 > Takara Shuzo Co., Ltd.

<120 > A DNA amplification method and a kit therefor

<130 > 98-031-PCT

<150 > JP 9/231885

<151 > 1997-8-14

<150 > JP 9/305016

<151 > 1997-10-21

<160 > 13

<210 > 1

<211 > 20

<212 > DNA

<213 > Artificial Sequence

<400 > 1

ccacagtgtc tgtatcggag

20

<210 > 2

<211 > 20

<212 > DNA

<213 > Artificial Sequence

<400 > 2

gtttccaact gccctatgac 20

<210 > 3

<211 > 22

<212 > DNA

<213 > Artificial Sequence

<400 > 3

cgtctaacag tggaagctga tc 22

<210 > 4

<211 > 22

<212 > DNA

<213 > Artificial Sequence

<400 > 4

catgacttca tacttctgcc tc 22

<210 > 5

<211 > 21

<212 > DNA

<213 > Artificial Sequence

<400 > 5

caagagatgg ccacggctgc t

21

<210 > 6

<211 > 21

<212 > DNA

<213 > Artificial Sequence

<400 > 6

tccttctgca tcctgtcggc a

21

<210 > 7

<211 > 20

<212 > DNA

<213 > Artificial Sequence

<400 > 7

gagactgtga gtagtgacac

20

<210 > 8

<211 > 20

<212 > DNA

<213 > Artificial Sequence

<400 > 8

ccatcccatc atcttggtac

20

<210 > 9

<211 > 20

<212 > DNA

<213 > Artificial Sequence

<400 > 9

ctaagaagcg agcactgacc

20

<210 > 10

<211 > 20

<212 > DNA

<213 > Artificial Sequence

<400 > 10

cagagggaag agttccccag

20

<210 > 11

<211 > 20

<212 > DNA

<213 > Artificial Sequence

<400 > 11

ccttggtctg gtaggagacg

20

<210 > 12

<211 > 21

<212 > DNA

<213 > Artificial Sequence

<400 > 12

cggcagtcgc tggagattat c

21

<210 > 13

<211 > 21

<212 > DNA

<213 > Artificial Sequence

<400 > 13

tctaggtcct ctacatggaa g

21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/03566

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁶ C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP, 07-509368, A (Gen-Probe Inc.), 19 October, 1995 (19. 10. 95) & WO, 94/03472, A & EP, 587298, A & US, 576684, A	1, 3, 4, 9, 10, 12, 16
Y	JP, 05-261000, A (F. Hoffman-La Roche AG.), 12 October, 1993 (12. 10. 93) & EP, 550883, A	1-16
Y	JP, 07-506245, A (North Shore University Hospital Research Corp.), 13 July, 1995 (13. 07. 95) & WO, 93/15225, A & EP, 651823, A & US, 5658764, A	1-16
PY	JP, 10-66596, A (Metin Colpan), 10 March, 1998 (10. 03. 98) & EP, 808906, A	1, 3, 4, 9, 10, 12, 16

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
20 August, 1998 (20. 08. 98)Date of mailing of the international search report
1 September, 1998 (01. 09. 98)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/03566

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Nucleic Acids Research Vol. 24 No. 24 (1996) Auer T. et al., "Selective amplification of RNA utilizing the *nucleotide* *analog* dITP and Thermus thermophilus DNA polymerase" p.5021-5025	1-16

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 98/03566

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁴ C 1 2 Q 1 / 6 8

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁴ C 1 2 Q 1 / 6 8

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, 07-509368, A (ジエンブ・ローブ・インコーポレイテッド) 19. 10月. 1995 (19. 10. 95), & WO, 94/03472, A & EP, 587298, A & US, 5766849, A	1, 3, 4, 9, 10, 12, 16
Y	JP, 05-261000, A (エフ.ホフマン・ラ ロシュ アクチュン ゲゼルシャフト) 12. 10月. 1993 (12. 10. 93), & EP, 550883, A	1-16
Y	JP, 07-506245, A (ノース・ショア・ユニバーシティ・ホスピタル・リサーチ・ コーポレーション) 13. 7月. 1995 (13. 07. 95), & WO, 93/15225, A & EP, 651823, A & US, 5658764, A	1-16
PY	JP, 10-66596, A (メイン コルパソ) 10. 3月. 1998 (10. 03. 98), & EP, 808906, A	1, 3, 4, 9, 10, 12, 16

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

20. 08. 98

国際調査報告の発送日

01.09.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新見 浩一

4 B

9 1 6 2

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Nucleic Acids Research Vol.24 No.24 (1996) Auer T. et al. 「Selective amplification of RNA utilizing the *nucleotide* *analog* dITP and Thermus thermophilus DNA polymerase」 p. 5021-5025	1-16